

МИНСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

 Д.Л. Пиневиц

 28.06.2019 г.



Регистрационный № 087-0619

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ
НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У
ДЕТЕЙ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»

Авторы: Т.М. Михалевская, Е.В. Волочник, д.м.н. Конопля Н.Е., д.м.н.,
член-корреспондент НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневич

28.06.2019

Регистрационный № 087-0619

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ
НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: Т. М. Михалевская, Е. В. Волочник, д-р мед. наук Н. Е. Конопля, д-р
мед. наук, чл.-кор. НАН Беларуси О. В. Алейникова

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения вероятности прогрессирования медуллобластомы, пилоцитарной астроцитомы и диффузной астроцитомы, который может быть использован в комплексе медицинских услуг по лечению опухолей головного мозга у детей.

Метод предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, врачей-патологоанатомов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающим медицинскую помощь пациентам, страдающим опухолями головного мозга.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Микротом.
2. Сухожаровой шкаф.
3. Автоматический иммуногистохимический стейнер.
4. Прямой светооптический микроскоп.
5. Вытяжной шкаф.
6. Водяные бани-термостаты (2 шт.).
7. Микроцентрифуга-вортекс.
8. Гибридизатор (с возможностью охлаждения рабочей поверхности от 85 до 37 °С в течение 1 мин).
9. Автоматические дозаторы переменного объема.
10. Холодильник (2–8 °С).
11. Морозильник (-20 °С).
12. Микроскоп флуоресцентный (общее увеличение x1 000; объектив x100 подпружиненный, для масляной иммерсии).

Перечень необходимых реактивов и расходных материалов:

1. Стекла с адгезивным электростатическим покрытием.
2. Реагенты для депарафинизации.
3. Буфер для демаскировки с высоким pH.
4. Универсальная визуализирующая система.
5. Контр-краситель.
6. Ксилол.
7. Монтирующая среда.
8. Первичные антитела к pERK1/2, BRAF V600E, H3K27trimethylated, ATRX, p53, IDH1R132H, beta-catenin, GAB1, NGFR.
9. Метанол.
10. Ледяная уксусная кислота.
11. ДНК-зонды для флуоресцентной *in situ* гибридизации, специфичные к хромосомным регионам 2p24/ген *MYCN*, 8q24/ген *MYC*, cen6 и 6q23, 17p13/17q21-22, 9p21-22/ген *CDKN2A* (p16).
12. Буфер для флуоресцентной *in situ* гибридизации.
13. Раствор 20xSSC.
14. Детергент NP40.
15. Рабочий раствор красителя DAPI (125 ng/mL).

16. Спирт этиловый 70, 80, 96°.
17. 0,25 % раствор трипсина.
18. Пепсин.
19. Раствор 1хDPBS.
20. Микропробирки объемом 1,5 и 0,5 мл.
21. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.
22. Предметные стекла.
23. Покровные стекла разных размеров: 18x18, 22x22, 24x24.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Наличие у пациентов моложе 18 лет медуллобластомы, пилоцитарной астроцитомы, диффузной астроцитомы II–IV степени злокачественности.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Гистологическое светооптическое исследование

Выполняют гистологическое исследование по стандартной технологии. Осуществляют светооптическое исследование микропрепарата биопсийного материала опухоли с определением нозологии (медуллобластома, пилоцитарная астроцитома, диффузные астроцитомы II–IV степени злокачественности, смешанные нейроглиальные опухоли). Также оценивают информативность материала и выбирают наиболее репрезентативные участки ткани для проведения иммуногистохимического и цитогенетического исследования. В зависимости от нозологии выбирают диагностическую панель:

для медуллобластомы определяют экспрессию иммунофенотипом beta-catenin, GAB1, NGFR, p53 и цитогенетически статус генов N-MYC, C-MYC, monob(del6q) и i17;

для пилоцитарной астроцитомы — экспрессию pERK1/2, BRAF V600E и статус гена CDKN2A;

для диффузной астроцитомы II–IV степени злокачественности — pERK1/2, BRAF V600E, H3K27me, ATRX, p53, IDH1R132H и статус гена CDKN2A.

2. Иммуногистохимическое исследование

Для иммуногистохимического исследования на микротоме нарезают срезы толщиной 3 мкм из выбранных готовых парафиновых блоков. Срезы ткани опухоли помещают на стекла с адгезивным электростатическим покрытием и высушивают в сухожаровом шкафу при температуре 100 °C в течение 60 мин. Депарафинизацию производят в автоматическом иммуногистохимическом стейнере с использованием коммерческого депарафинизирующего раствора с последующей тепловой демаскировкой эпитопа в коммерческом буфере с высоким pH при температуре 37 °C в течение 30 мин.

После экспозиции соответствующими первичными антителами в течение 32 мин при температуре 37 °С на препараты наносят коммерческую визуализирующую систему, содержащую универсальную визуализирующую систему на основе полимера; DAB-хромоген; DAB-субстрат; wash буфер; пероксидазный блок. Затем предметные стекла докрашивают контр-красителем в течение 8 мин, промывают в теплой мыльной воде, обезвоживают с помощью спиртов с восходящей концентрацией, в ксилоле, покрывают с использованием монтирующего реагента.

Результаты оценивают с использованием светового микроскопа. Позитивным считают окрашивание на p53 при ядерном окрашивании более 10 % опухолевых клеток при подсчете не менее 1000 клеток, на beta-catenin — при наличии цитоплазматического и ядерного окрашивания, на ATRX, H3K27me — при наличии ядерного окрашивания более 10 % опухолевых клеток, на GAB1 — при наличии диффузного цитоплазматического окрашивания, на NGFR — при наличии мембранного окрашивания, на BRAF V600E и IDH1 R132H — при наличии цитоплазматического окрашивания; гиперэкспрессия pERK1/2 учитывалась при наличии ядерного и цитоплазматического окрашивания более чем в 25 % опухолевых клеток. Экспрессию BRAF V600E изучают в комплексе с оценкой pERK1/2 для исключения ложнопозитивной экспрессии BRAF V600E.

3. Цитогенетическое исследование

Препараты переносятся в предварительно прогретый раствор 2xSSC (37 °С, 30 мин для мазков-отпечатков; 80 °С, 10 мин для FFPE). Охлаждаются в дистиллированной воде 3 мин и подсушиваются 2 мин при комнатной температуре. Далее переносятся в заранее прогретый до 37 °С рабочий раствор трипсина (на 45–55 мин для FFPE) или пепсина (на 3 мин при мазках-отпечатках). После ферментной обработки срез промывается в дистиллированной воде, подсушивается при комнатной температуре и дегидратируется при помощи серии спиртов (70, 80, 96°) по 2 мин в каждом растворе. Время и температура денатурации и гибридизации осуществляется согласно рекомендациям фирмы-производителя при помощи гибридизатора.

После окончания гибридизации с препаратов снимаются покровные стекла, их отмывают в растворах 0,4xSSC с добавлением 0,3 % NP40 и 2xSSC с добавлением 0,1 % NP40 (температура и время согласно рекомендациям фирмы-производителя зонда). Затем выполняется дегидратация стекол в серии спиртов и их дальнейшая сушка при комнатной температуре в темноте (20–30 мин). После высыхания в зону интереса наносится рабочий раствор DAPI.

Анализ начинается через 10–15 мин после нанесения раствора DAPI. Исследование производится под соответствующими флуорохромом фильтрами. При невозможности анализа в день окраски стекла можно поместить в холодильник (2–8 °С) на несколько дней или в морозильник (-20 °С) на 1–2 недели без потери качества изображения. Анализ и регистрация данных производят в соответствии с рекомендациями ISCN2013. При подсчете диффузно располагающихся клеток с aberrантным расположением сигнала среди клеток с нормальным статусом учитывается процент анализируемого клона: для мазков-

отпечатков положительным результатом считается более 15 % клеток, для FFPE — более 30–35 %.

Определение вероятности прогрессирования нейроэпителиальных опухолей головного мозга у детей

Метод определения вероятности прогрессирования нейро-эпителиальных опухолей головного мозга у детей представлен в виде таблицы.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ ИСПРАВЛЕНИЯ

1. Использование реагентов, условия хранения которых не соблюдались.

Устранение: соблюдать условия хранения.

2. Неточное дозирование реагентов.

Устранение: ежегодно проверять автоматические дозаторы переменного объема.

3. Нарушения в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.).

Устранение: точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.